

WO 94/07539

18dec97 11:16:08

File 351:DERWENT WPI 1963-1997/UD=9749;UP=9746;UM=9744
(c)1997 Derwent Info Ltd

4/9/1

DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI
(c)1997 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009830584

WPI Acc No: 94-110440/199414

XRAM Acc No: C94-051071

Microcapsules for diagnosis and/or therapy - with shell or copolymer
comprising synthetic polymer and biopolymer components

Patent Assignee: SCHERING AG (SCHD)

Inventor: FRITZSCH T; HELDMANN D; WEITSCHIES W

Number of Countries: 028 Number of Patents: 011

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
DE 4232755	A1	19940331	DE 4232755	A	19920926	B	199414 B
WO 9407539	A1	19940414	WO 93EP2422	A	19930908	B	199416
AU 9349592	A	19940426	AU 9349592	A	19930908	B	199432
NO 9501138	A	19950324	WO 93EP2422	A	19930908	B	199524
			NO 951138	A	19950324		
FI 9501379	A	19950323	WO 93EP2422	A	19930908	B	199525
			FI 951379	A	19950323		
ZA 9307099	A	19950531	ZA 937099	A	19930924	B	199527
EP 662005	A1	19950712	EP 93919293	A	19930908	B	199532
			WO 93EP2422	A	19930908		
CN 1089508	A	19940720	CN 93118159	A	19930925	B	199534
JP 8504398	W	19960514	WO 93EP2422	A	19930908	B	199646
			JP 94508620	A	19930908		
NZ 255409	A	19970224	NZ 255409	A	19930908	B	199715
			WO 93EP2422	A	19930908		
HU 71683	T	19960129	WO 93EP2422	A	19930908	B	199738
			HU 95876	A	19930908		

Priority Applications (No Type Date): DE 4232755 A 19920926

Cited Patents: 1. journal ref.; EP 327490; EP 441468; EP 458745; WO 9217213

Patent Details:

Patent	Kind	Lan	Pg	Filing Notes	Application	Patent
--------	------	-----	----	--------------	-------------	--------

DE 4232755 A1 8

WO 9407539 A1 G 31

Designated States (National): AU CA FI HU JP KR NO NZ US

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

AU 9349592 A Based on WO 9407539

ZA 9307099 A 34

EP 662005 A1 G Based on WO 9407539

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE

JP 8504398 W 25 Based on WO 9407539

NZ 255409 A Based on WO 9407539

HU 71683 T Based on WO 9407539

Abstract (Basic): DE 4232755 A

Microcapsules for diagnosis and/or therapy have a size of 0.5-8 microns and comprise: (a) a shell comprising a copolymer (I) and opt. one or more pharmaceutical agents; and (b) a core comprising a gas and/or one or more pharmaceutical agents or (I). (I) comprises a synthetic polymer component (II) and a biopolymer component (III) in a (III):(II) wt. ratio of 10:90 to 80:20. (II) is not derived from polymerisable aldehydes. (III) has location-, structure- or tissue-specific properties or has functional gps. to which opt. chelating ligands or their metal complexes and/or location-, structure- or tissue-specific substances may be bound. Also claimed is a process for preparing the above microcapsules. Also claimed is a contrast agent contg. the microcapsules suspended in a pharmaceutically acceptable medium.

USE - The gas-filled capsules are useful as ultrasonic contrast agents. Capsules contg. complexed paramagnetic metal ions are useful as NMR contrast agents. Capsules contg. complexed radionuclides are useful for scintigraphic imaging. Disclosed uses include diagnosis or therapy of thrombosis, atherosclerosis, hormonal function, vascular endothelial lesions and tumours.

Dwg. 0/0

Title Terms: MICROCAPSULE; DIAGNOSE; THERAPEUTIC; SHELL; COPOLYMER; COMPRISE; SYNTHETIC; POLYMER; COMPONENT

Derwent Class: A96; B04; B07

International Patent Class (Main): A61K-000/00; A61K-009/50; A61K-049/00

International Patent Class (Additional): A61K-051/00; B01J-013/18

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): A12-V01; A12-V03C2; B04-C03; B12-K04; B12-M11E

Chemical Fragment Codes (M1):

02 H1 H101 H182 J0 J011 J1 J171 M280 M315 M321 M332 M343 M349 M381 M391
M423 M431 M510 M520 M530 M540 M782 M903 M904 P520 P625 P633 P813
P814 P831 Q505 R033 V917 V921 9414-04301-M

Chemical Fragment Codes (M2):

03 C106 C108 C530 C730 C800 C801 C802 C803 C805 C807 M411 M431 M782
M903 M904 M910 P520 P625 P633 P813 P814 P831 Q505 R033 R01066-M
04 C107 C520 C810 M411 M431 M782 M903 M904 M910 P520 P625 P633 P813
P814 P831 Q505 R033 R01738-M
05 C108 C550 C810 M411 M431 M782 M903 M904 M910 P520 P625 P633 P813
P814 P831 Q505 R033 R01779-M
06 H1 H103 H183 J0 J014 J1 J173 M280 M311 M312 M322 M323 M332 M342 M349
M381 M383 M392 M393 M416 M431 M620 M782 M903 M904 M910 P520 P625
P633 P813 P814 P831 Q505 R033 R00268-M
07 A349 A543 A764 A940 A960 C710 C730 C811 C812 M411 M417 M431 M782
M903 M904 P520 P625 P633 P813 P814 P831 Q505 R033 R19007-M R19778-M
R20024-M

Polymer Indexing (PS):

<01>

001 017; R00446 G0282 G0271 G0260 G0022 D01 D12 D10 D51 D53 D58 D60 D83
F36 F35; H0000; H0011-R; S9999 S1412 S1401; S9999 S1423 S1401;
P0088 ; P0099
002 017; R00444 G0453 G0260 G0022 D01 D12 D10 D51 D53 D58 D83 F70;
H0000; H0011-R; S9999 S1412 S1401; S9999 S1423 S1401; P0088
003 017; R01453 G0511 G0260 G0022 D01 D12 D10 D51 D53 D58 D64 D69 D83
F40 C1 7A; H0000; H0011-R; S9999 S1412 S1401; S9999 S1423 S1401;
P0088

- *004* 017; R00799 G0340 G0339 G0260 G0022 D01 D11 D10 D12 D23 D22 D31 D42
D51 D53 D58 D63 D86 F47 F41; H0000; H0011-R; P0464-R; S9999 S1412
S1401; S9999 S1423 S1401; P0088
- *005* 017; G0420 G0339 G0260 G0022 D01 D12 D10 D51 D53 D58 D63 F12 F41;
H0000; H0011-R; S9999 S1412 S1401; S9999 S1423 S1401; P0088
- *006* 017; G3736 G3714 P0599 D01 F70; R24039 G3714 P0599 D01 F70; R24033
G3714 P0599 D01 F70; R24034 G3714 P0599 D01 F70
- *007* 017; ND01; K9745-R; K9574 K9483; K9610 K9483; K9687 K9676; K9712
K9676; B9999 B3021 B3010; Q9999 Q8026 Q7987; Q9999 Q7998 Q7987;
Q9999 Q8037 Q7987

Derwent Registry Numbers: 0268-U; 1066-U; 1738-U; 1779-U

Specific Compound Numbers: R01066-M; R01738-M; R01779-M; R00268-M; R19007-M
; R19778-M; R20024-M

Generic Compound Numbers: 9414-04301-M

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation 5 : A61K 49/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/07539</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. April 1994 (14.04.94)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/02422</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 8. September 1993 (08.09.93)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 42 32 755.5 26. September 1992 (26.09.92) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, Postfach 65 03 11, D-13342 Berlin (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : FRITZSCH, Thomas [DE/DE]; Elisenstrasse 2, D-12169 Berlin (DE). HELDMANN, Dieter [DE/DE]; Krefelder Strasse 3, D-10555 Berlin (DE). WEITSCHIES, Werner [DE/DE]; Jagowstrasse 20, D-10555 Berlin (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, FI, HU, JP, KR, NO, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	

(54) Title: **MICROPARTICLE PREPARATIONS MADE FROM BIODEGRADABLE COPOLYMERS**

(54) Bezeichnung: **MIKROPARTIKELPRÄPARATIONEN AUS BIOLOGISCH ABBAUBAREN MISCHPOLYMEREN**

(57) Abstract

The invention concerns microparticle preparations made from biodegradable copolymers for therapeutic and diagnostic use, in particular for ultrasonic examinations, plus a method of producing such preparations.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Mikropartikelpräparationen aus biologisch abbaubaren Copolymeren zur Verwendung in Therapie und Diagnostik, insbesondere der Ultraschalldiagnostik, sowie ein Verfahren zu deren Herstellung.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MR	Mauritanien
AU	Australien	FR	Frankreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GA	Gabon	NE	Niger
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	HU	Ungarn	PL	Polen
BR	Brasilien	IE	Irland	PT	Portugal
BY	Belarus	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slowakische Republik
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LV	Lettland	TC	Togo
CZ	Tschechische Republik	MC	Monaco	UA	Ukraine
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	ML	Mali	UZ	Usbekistan
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Mikropartikelpräparationen aus biologisch abbaubaren Mischpolymeren

Die Erfindung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten
5 Gegenstand, d.h. aus Biopolymeren, zur Polymerisation befähigten
Monomeren, Wirkstoffen und/oder diagnostisch nachweisbaren Bestandteilen
hergestellte Mikropartikel, ein Verfahren zu deren Herstellung sowie deren
Verwendung in Diagnostik und Therapie, insbesondere als Kontrastmittel in
der Ultraschalldiagnostik.

10 Es ist bekannt, daß Partikel, deren Durchmesser kleiner oder im Bereich der
Größe roter Blutzellen ist, nach Injektion in die Blutstrombahn innerhalb des
Blutgefäßsystems zirkulieren können. Pharmazeutische Präparationen
derartiger Mikropartikel eignen sich deshalb als in das Blutgefäßsystem
15 injizierbare Trägersysteme für Wirkstoffe oder Diagnostika in der Medizin.
Als Trägermaterialien kommen prinzipiell alle biologisch abbaubaren,
verträglichen und nicht wasserlöslichen Stoffe in Betracht. Beschrieben sind
bisher vor allem Fette, Wachse, Lipide (z.B. Sojalecithin), denaturierte
Biopolymere (z.B. Albumin, Gelatine) und synthetische biologisch abbaubare
20 Polymere (z.B. Polymilchsäure, Polyhydroxybuttersäure,
Polyalkylcyanoacrylate, Poly-L-Lysin).

Die in der Blutstrombahn zirkulierenden Mikropartikel werden in Abhängigkeit
von ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften unterschiedlich
25 schnell und in unterschiedlicher Anzahl durch die Zellen des monozytären
phagozytierenden Systems (MPS) erkannt und aufgenommen (vorwiegend in
Leber, Lunge und Milz). Als wesentliche Faktoren, die die Kinetik der
Aufnahme der Mikropartikel durch die Zellen des MPS bestimmen, werden
die Partikelladung, die Partikelgröße, die Eigenschaften (Molekulargewicht,
30 Amphiphilie) an der Partikeloberfläche adsorbierter Substanzen, sowie die
Affinität der Partikeloberfläche für Blutkomponenten wie Fibronektin,
Albumin, etc. angesehen. Durch gezielte Variation der physiko-chemischen
Oberflächeneigenschaften von Mikropartikeln kann die Kinetik der
Phagozytose durch die Zellen des MPS und das Ausmaß der Anreicherung
35 der Partikel innerhalb der entsprechenden Organe (u.a. Leber, Lunge, Milz,
Knochenmark) beeinflußt werden (passives targeting). Eine spezifische
Anreicherung von Mikropartikeln in Zielgeweben oder Körperstrukturen, die

-2-

nicht zu den Organen des RES gehören, ist auf diese Weise nicht möglich. Sie läßt sich vielmehr nur durch die Kombination der Mikropartikel mit Substanzen erzielen, die orts-, struktur- oder gewebespezifische Bindungseigenschaften besitzen (homing devices). Die bisher zur
5 Anwendung in der Ultraschalldiagnostik beschriebenen Partikel eignen sich jedoch nur unzureichend als zur Kombination mit homing devices geeignete Präparationen.

So muß bei den in EP O 458 079 und DE 38 03 972 beschriebenen
10 Kontrastmitteln in Kauf genommen werden, daß sie nur mit Hilfe aufwendiger Verfahren hergestellt werden können, die die Verwendung organischer Lösungsmittel erforderlich machen, deren Einsatz aus Gründen des Umwelt- und Arbeitsplatzschützes bedenklich ist. Zusätzlich muß vor Anwendung der Präparationen sichergestellt werden, daß die verwendeten
15 organischen Lösungsmittel nicht mehr in dem pharmazeutisch zu verwendenden Produkt enthalten sind. Darüber hinaus sind zur Herstellung oberflächenaktive Hilfsstoffe (z.B. Tenside) notwendig, die bei Injektionspräparaten häufig als bedenklich angesehen werden. Weiterhin ist eine Steuerung des Anreicherungsverhaltens in verschiedenen Organen bei
20 diesen Partikeln nicht steuerbar, eine Verknüpfung der Partikel der DE 38 03 972 mit sich selektiv anreichernden Verbindungen (sogenannten homing devices wie z.B. monoklonalen Antikörpern) ist nicht möglich.

Die in DE 40 04 430 beschriebenen Mikropartikel aus polymerisierten
25 Aldehyden sind aufgrund der unklaren biologischen Abbaubarkeit ebenfalls nicht als Träger für substanz- oder strukturspezifische Substanzen geeignet. Ein weiterer Nachteil ist es, daß auch in diesem Falle zur Herstellung der Partikel oberflächenaktive Hilfsstoffe erforderlich sind.

30 Die in der EP O 224 934 beschriebenen Mikropartikel aus Proteinen, insbesondere aus Albumin weisen eine nur sehr geringe *In vitro*- und *In vivo*-Stabilität auf.

Es war deshalb die Aufgabe der Erfindung, Mikropartikelpräparationen
35 insbesondere für die Anwendung in der Ultraschalldiagnostik zu schaffen, die ohne den Einsatz physiologisch bedenklicher Lösungsmittel oder Hilfsstoffe (z.B. Tenside) auskommen, leicht herstellbar und biologisch abbaubar sind, die entweder Substanzen mit orts- struktur- oder gewebespezifischen

-3-

Bindungseigenschaften im Wandmaterial enthalten oder mit solchen kovalent verknüpft werden können und die eine ausreichende *In vitro*- und *In vivo*-Stabilität aufweisen.

- 5 Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch Mikropartikel gelöst, deren Hülle aus der Kombination von Biopolymeren - bevorzugt Polypeptiden (auch glykosilierten) - und synthetischem, während der Herstellung polymerisiertem Material gebildet wird.
- 10 Ein Gegenstand der Erfindung sind daher Mikropartikel aus einem Copolymerisat aus mindestens einem synthetischen Polymeren und mindestens einem Biopolymeren, wobei sich als Biopolymere vorzugsweise natürliche, synthetisch oder partialsynthetisch hergestellte oder gentechnologisch gewonnene Polypeptide wie z.B. Albumin,
- 15 Collagenabbauprodukte, Gelatine, Fibrinogen, Fibronektin, Polygeline, Oxypolygelatine, deren Abbauprodukte sowie Poly-L-Lysin eignen. Die Biopolymere können auch glykosiliert sein. Als polymerisierbare Monomere eignen sich vorzugsweise Alkylcyanoacrylate, Acrylsäure, Acrylamid, Acrylsäurechlorid und Acrylsäureglycidester.
- 20 Die erfindungsgemäßen Mikropartikel eignen sich bei Herstellung in gasgesättigter Lösung durch den Einschluß des Gases besonders als Kontrastmittel für Ultraschalluntersuchungen. Sie wirken im Ultraschallfeld aufgrund des enthaltenen Gases als hocheffektive Streukörper. Desweiteren
- 25 können sie durch diagnostischen Ultraschall zur Ausstrahlung eigenständiger Signale angeregt werden, welche z.B. mit Hilfe der Farbdopplertechnik ausgewertet werden können.
- 30 Als Gase kommen infrage Luft, Stickstoff, Kohlendioxid, Sauerstoff, Helium, Neon, Argon, Krypton oder deren Gemische. Die Beladung mit dem entsprechenden Gas oder Gasgemisch erfolgt durch Herstellung der Partikel in einer mit dem jeweiligen Gas oder Gasgemisch gesättigten wässrigen Lösung.
- 35 Die Mikropartikel können auch (gegebenenfalls zusätzlich) weitere mit Hilfe medizinisch-diagnostischer Verfahren, wie Magnetresonanztomographie, Magnetresonanzspektroskopie, Szintigraphie oder hochempfindlichen Magnetfeldmessungen mit geeigneten Magnetometern (Biomagnetismus)

-4-

detektierbare Substanzen sowohl mikroverkapselt als auch im Wandmaterial als auch (gegebenenfalls mit Hilfe geeigneter Substanzen wie z.B. Chelatbildnern) an das Wandmaterial gekoppelt, enthalten. So ist es z.B. bei Verwendung radioaktiver Isotope möglich, die erfindungsgemäßen

5 Mikropartikel in der Szintigraphie einzusetzen. Ebenso ist ihre Verwendung als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie, Magnetresonanzspektroskopie oder bei Messungen des magnetischen Feldes durch die Mikroverkapselung oder Inkorporation in das Wandmaterial von geeigneten para-, superpara-, ferri- oder ferromagnetischen Substanzen

10 möglich.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Partikel (bei Einhaltung ausreichender Konzentrationen an Biopolymeren) der Zusatz von grenzflächenaktiven Substanzen, wie z.B.

15 Tensiden nicht erforderlich ist. Dies stellt gegenüber den bisher bekannten Herstellungsverfahren für Mikropartikel auf der Basis von synthetischen Polymeren einen entscheidenden Vorteil dar, da die zur Erniedrigung der Grenzflächenspannung und zur Verhinderung der Partikelaggregation üblicherweise notwendigen Tenside als physiologisch bedenklich angesehen

20 werden und deshalb vor der Anwendung im Organismus wieder bis auf verträgliche Restgehalte aus den Präparationen zu entfernen sind.

Als weiter Vorteil der erfindungsgemäßen Mikropartikelpräparationen sind die vielfältigen, dem jeweiligen Verwendungszweck anpaßbaren,

25 Partikeleigenschaften zu nennen, die durch Variation verschiedener Herstellungsparameter leicht steuerbar sind. So können durch die Wahl des jeweils verwendeten Biopolymeren bzw. durch Veränderungen der funktionellen Gruppen des Biopolymeren (z.B. durch Acylierung mit Dicarbonsäureanhydriden, wie Bernsteinsäure-, Diglykolsäure-, Glutarsäure-,

30 Maleinsäure- oder Fumarsäureanhydrid oder durch Acetylierung mit Monocarbonäureanhydriden, wie Essigsäureanhydrid oder Propionsäureanhydrid) die pharmakokinetischen Parameter der Mikropartikelpräparationen (Organverteilung, Aufenthaltsdauer in der Blutstrombahn) beeinflusst werden.

35 Weiterhin kann der Gehalt des Biopolymeren im Wandmaterial in einem breiten Rahmen variiert werden, wodurch es möglich ist, die Zeitdauer des biologischen Abbaus des Kapselmaterials *in vivo* zu beeinflussen und dem

-5-

gewünschten Verwendungszweck anzupassen. Dieser Gehalt läßt sich direkt über den Anteil des Biopolymeren in der Herstellungslösung steuern. So besteht beispielsweise das Wandmaterial von nach Beispiel 1 aus 1 % (V/V) Butylcyanoacrylsäure und 5 % Gelatine enthaltender autoklavierter wässriger Lösung hergestellter erfindungsgemäßer Mikropartikel zu 55 % (M/M) aus Biopolymeren, während bei gleichem Einsatz an Butylcyanoacrylat bei in 2,5 % iger wässriger autoklavierter Gelatinelösung hergestellten Mikropartikeln das Wandmaterial zu 35 % (M/M), bei in 7,5 % iger wässriger autoklavierter Gelatinelösung hergestellten Mikropartikeln das Wandmaterial zu 65 % (M/M) aus Biopolymeren besteht.

Überraschenderweise sind die erfindungsgemäßen Mikropartikel ohne Zusatz weiterer Hilfstoffe wie Laktose, Mannitol oder Sorbitol, wie sie üblicherweise zur Gefriertrocknung als Gerüstbildner eingesetzt werden, gefriertrockenbar. Diese Gerüstbildner sind nach der Trocknung für die mechanische Zerstörung eines erheblichen Teils der Mikrokapseln verantwortlich, der dann nicht mehr für die bildgebung nutzbar ist. Im Gegensatz dazu dient im Falle der erfindungsgemäßen Mikropartikel das im Überschuß eingesetzte Biopolymere des Wandmaterials als Gerüstbildner, wodurch überraschenderweise das Verhältnis von intakten zu zerstörten Mikrokapseln drastisch verbessert wird. Aufgrund dieses günstigeren Verhältnisses kann die zur Bildgebung erforderliche Dosis deutlich verringert werden.

Die erfindungsgemäßen Mikropartikel können jedoch auch - gegebenenfalls zusätzlich - pharmazeutische Wirkstoffe inkorporiert enthalten, indem z.B. das kontrastgebende Agens (im Fall von Kontrastmitteln für Ultraschalluntersuchungen handelt es sich dabei um ein Gas oder Gasgemische) und ein oder mehrere Wirkstoffe in den Partikeln mikroverkapselt werden. Vorzugsweise können die Wirkstoffe auch mit den für die orts-, struktur- oder gewebespezifischen Substanzen beschriebenen Methoden in das Wandmaterial inkorporiert werden. Falls es es sich bei den Wirkstoffen um Biopolymere handelt, können sie das Wandmaterial teilweise auch selbst bilden, indem sie bei der Herstellung entweder ausschließlich oder im Gemisch mit anderen geeigneten Biopolymeren (z.B. Gelatine, Albumin, Fibronectin, Poly-L-lysin) als Ausgangsmaterial zur Mikropartikelpräparation unter Zusatz eines polymerisierbaren Monomeren oder Oligomeren eingesetzt werden. Der besondere Vorteil der Kopplung von Wirkstoffen an den Biopolymeranteil des Kapselmaterials liegt darin, daß

-6-

Wirkstoffe, die z.B. über Peptidbindungen an den Biopolymeranteil des Kapselmaterials gebunden sind, durch enzymatischen Abbau *in vivo* freigesetzt werden können.

- 5 Die erfindungsgemäßen Mikropartikel dienen insbesondere dem Nachweis oder der Therapie von Thrombosen und atherosklerotischen Veränderungen. Als besonders vorteilhaft ist dabei die Verwendung von Antikörpern oder Antikörperfragmenten gegen Fibrin, fibrinbindenden Plasmaproteinen oder deren Teilstrukturen, Gewebsplaminogenaktivator oder Teilstrukturen davon
10 (z.B. Typ I-Homologie und Kringelsequenzen), Proteinbestandteilen von Lipoproteinen (auch Teilstrukturen) als homing devices anzusehen.

- Weitere Anwendungsgebiete für die erfindungsgemäßen Mikropartikel können z.B. auch die Diagnose oder die Therapie hormoneller Funktionen
15 sein (als besonders vorteilhaft ist hierbei die Verwendung von Peptidhormonen oder deren Abwandlungsprodukten mit der Fähigkeit zur Rezeptorbindung als homing devices anzusehen), oder die Diagnose oder Therapie von Läsionen von Blutgefäßendothelien (als besonders vorteilhaft ist hierbei entweder die Verwendung von Antikörpern bzw.
20 Antikörperfragmenten gegen Substanzen aus der Integrin-Gruppe, insbesondere die Selectine wie z.B. LAM-1, ELAM-1 und GMP-140, oder die Verwendung von Rezeptoren bzw. deren bindungsvermittelnden Bruchstücke für Substanzen aus der Integrin-Gruppe, insbesondere die Selectine wie z.B. LAM-1, ELAM-1 und GMP-140, als homing devices anzusehen).
25 Darüberhinaus können die erfindungsgemäßen Mikropartikel auch zur Diagnose oder Therapie von Tumoren genutzt werden, indem Antikörper oder Antikörpergemische gegen Oberflächenantigene von Tumoren als homing devices verwendet werden.

- 30 Die Herstellung der erfindungsgemäßen Mikropartikel erfolgt durch die Polymerisation eines geeigneten reaktiven Monomeren oder Oligomeren (z.B. Cyanacrylsäurebutylester, Cyanacrylsäureisobutylester, Cyanacrylsäureisopropylester, Cyanacrylsäurepropylester, Cyanacrylsäureisohexylester, Cyanacrylsäurehexylester,
35 Cyanacrylsäuremethylester, Acrylsäure, Acrylamid, Acrylsäureglycidester, Acrylsäurechlorid) in einer Konzentration bezogen auf das Gesamtvolumen der Herstellungslösung von 0,01 - 10 % (m/V) (vorzugsweise 0,1 - 10 %) unter geeigneten Bedingungen (z.B. durch Wahl des pH, durch Zusatz von

-7-

Radikalen, und durch UV-Einstrahlung) unter Dispergieren in wässriger Phase, die ein Biopolymer, z.B. Albumin, Gelatine, Oxypolygelatine, Polygeline, Fibronektin, Poly-L-Lysin in einer Konzentration von 0,5 - 20 % (m/V) (vorzugsweise 1% - 15 % (m/V)) gelöst enthält. Bei Verwendung von 5 Collagenabbauprodukten wie z.B. Gelatine, Polygeline oder Oxypolygelatine ist es häufig vorteilhaft, die Lösungen vor der Mikropartikelherstellung zu autoklavieren. Nach beendeter Polymerisation werden die entstandenen Mikropartikel je nach Dichte und Partikelgröße durch einmalige oder mehrmalige Zentrifugation, Filtration oder Flotation abgetrennt, 10 gegebenenfalls durch Dialyse weiter gereinigt und in einem physiologisch verträglichen Suspensionsmittel (vorzugsweise Wasser für Injektionszwecke) bis zur gewünschten Konzentration suspendiert. Die Suspensionen können durch den Zusatz geeigneter wasserlöslicher Stoffe wie z.B. Glucose, Mannitol, Sorbitol, Kochsalz, Galactose, Laktose, Fruktose, Trehalose 15 isotonisiert werden.

Die Größenverteilung der bei der Herstellung entstehenden Mikropartikel ist durch die Art des verwendeten Rührgerätes und die Umdrehungszahl in weiten Bereichen steuerbar.

20 Die Herstellung gasgefüllter Mikropartikel erfolgt, indem die Reaktion in einer mit dem gewünschten Gas gesättigten Lösung durchgeführt wird. Dabei ist die Dichte der resultierenden Mikropartikel, d.h. das Verhältnis zwischen Wandmaterial und Gasanteil, sowohl durch die Rührbedingungen als auch 25 insbesondere durch den Anteil an Biopolymeren beim Herstellungsprozess steuerbar.

Sollen Mikropartikel erhalten werden, bei denen der Kern aus demselben Material wie die Hülle besteht, so ist bei der Herstellung darauf zu achten, 30 daß durch die Wahl eines geeigneten Rührgerätes und einer geeigneten Rührgeschwindigkeit ein Schäumen der Reaktionslösung vermieden wird.

Die geforderte Kombinierbarkeit mit orts-, struktur- oder gewebsspezifischen Substanzen, die eine zusätzliche Anreicherung der Mikropartikel in 35 Zielgebieten außerhalb der Organe des RES sicherstellen sollen (homing devices), erfolgt entweder über die vor der Mikropartikelpräparation oder nachträglich durchgeführte Kopplung der Substanzen an die das Hüllmaterial mitbildenden Polypeptide mit bekannten Methoden der Biochemie zur

-8-

Kopplung von Aminosäuren (z.B. W. König, R. Geiger: Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen. Chem. Ber. 103, 788-798 (1970)), oder dadurch, daß die Mikropartikel in einer wässrigen Lösung der orts-, struktur- oder gewebspezifischen Substanz hergestellt werden, falls diese ein Polypeptid darstellt, so daß die Substanz direkt als Bestandteil des Hüllmaterials dient.

Als an die Mikropartikel koppelbare, oder das Hüllmaterial mitbildende orts-, struktur-, oder gewebspezifische Substanzen kommen vorzugsweise Antikörper, konjugierte Antikörper, Hormone (insbesondere Peptidhormone), Transferrin, Fibronektin, Heparin, Transcobalamin, epidermaler Wachstumsfaktor, Lipoproteine, Plasmaproteine sowie deren spezifitätsvermittelnden Teilstrukturen und Oligopeptide wie RGD, RGDS, RGDV und RGDT in Betracht.

Als an die Mikropartikel koppelbare chelatisierende Liganden kommen Diethylentriaminpentaessigsäure oder deren Derivate infrage. Die Verknüpfung dieser Liganden mit den Partikeln erfolgt in an sich bekannter Weise [Hanatowich et al., Science 220 (1983) 613]. Anschließend werden die Partikel mit den gewünschten Metallionen zu dem jeweiligen partikelfixierten Metallkomplex umgesetzt.

Die Wahl des verwendeten Metallions richtet sich nach dem gewünschten Anwendungsbereich. Im Bereich der NMR-Diagnostik werden erfindungsgemäß bevorzugt paramagnetische Metallionen der Elemente der Ordnungszahlen 21-29 und 57-70, insbesondere Gadolinium(III)ionen, eingesetzt. Für die Anwendung in der Szintigraphie finden geeignete Emittierer radioaktiver Strahlung, bevorzugt ^{111}In oder $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I und ^{131}I Anwendung.

Die fertigen Mikropartikelsuspensionen können direkt für den jeweiligen vorbestimmten Verwendungszweck eingesetzt werden, jedoch hat es sich zur Verbesserung der Lagerstabilität als vorteilhaft erwiesen, die Suspensionen unter Zusatz von Gerüstbildnern (wie z.B. Trehalose, Polyvinylpyrrolidon, Laktose, Mannitol, Sorbitol, Glycin), die auch zur Einstellung der Tonizität dienen können, einzufrieren und anschließend gefrierzutrocknen. Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen das im

- Überschuß eingesetzte Biopolymere selbst als Gerüstbildner einzusetzen. In beiden Fällen ist es zweckmäßig, die Suspensionen während des Einfrierens zu bewegen, um ungleiche Partikelverteilungen im gefrorenen Gut durch Sedimentation oder Flotation zu verhindern. Die Herstellung der
- 5 gebrauchsfertigen, injizierbaren Suspensionen aus den gefriergetrockneten Zubereitungen, erfolgt durch Resuspendieren des Lyophilisats in einem pharmazeutisch akzeptablen Suspensionsmedium wie z.B. Wasser p.i., wäßrige Lösungen eines oder mehrerer anorganischer Salze wie physiologische Elektrolyt-Lösungen, wäßrige Lösungen von Mono- oder
- 10 Disacchariden wie Glucose oder Lactose, Zuckeralkoholen wie Mannit enthalten, bevorzugt jedoch in für Injektionszwecke geeignetem Wasser. Die Gesamtkonzentration der gegebenenfalls gelösten Stoffe beträgt 0-20 Gewichts-Prozent.
- 15 Die Konzentration des gebrauchsfertigen Kontrastmittels kann im Bereich von 0,01 bis 20 mg, bevorzugt von 0,5 bis 6 mg Partikel/ml Suspensionsmedium eingestellt werden. Die injizierte Dosis ist abhängig vom jeweiligen Verwendungszweck; sie liegt bei ultraschalldiagnostischen Untersuchungen bei der Untersuchung der Gefäße im Bereich 1 bis 500 μg ,
- 20 bevorzugt zwischen 10 und 100 μg Partikel/kg Körpergewicht, bei der Untersuchung von Leber und Milz mittels Farbdopplersonographie im Bereich von 50 bis 1000, bevorzugt zwischen 200 und 600 μg /kg Körpergewicht. Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert:

Beispiel 1

In 300 ml destilliertem Wasser werden 15 g Gelatine (300 Bloom) gelöst und mit Salzsäure auf pH 3,0 eingestellt. Die Lösung wird 30 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Erkalten auf Raumtemperatur wird der pH-Wert der Lösung zu pH 5,0 korrigiert (mit Natronlauge) und in einem 2000 ml Becherglas mit einem schnellaufenden Rührer bei 10000 Upm gerührt. Zu der Lösung werden unter Rühren 3 ml Cyanacrylsäurebutylester langsam (10 Minuten) zugetropft. Die entstehenden Mikropartikel werden 60 Minuten weitergerührt. Danach wird die Suspension in einem Scheidetrichter 2 d flotiert. Der Unterstand wird abgelassen und der Überstand wird mit destilliertem Wasser zu 100 ml ergänzt. Die Suspension enthält gasgefüllte, schallaktive Mikropartikel in einer Größe von ca. 0,1 - 8 µm, wobei durch zusätzliche Flotation oder Filtration erforderlichenfalls die Teilchengrößen weiter eingeengt werden können (z.B. auf 0,5 - 3 µm). Die Kapselwand der Mikropartikelartikel besteht zu ca. 55 % (M/M) aus Polypeptiden und zu ca. 45 % (M/M) aus Polycyanacrylsäurebutylester. Die Partikel sind ohne den Zusatz grenzflächenaktiver Hilfsstoffe in Wasser dispergierbar. Sie neigen nicht zur Aggregation. Durch den Zusatz eines geeigneten Hilfsstoffes (z.B. Glucose, Natriumchlorid, Mannitol, Laktose, Galaktose) kann die Suspension isotonisiert werden.

Die Suspension läßt sich erforderlichenfalls zur Erhöhung der Lagerstabilität ohne Verlust ihrer Eignung als Kontrastmittel für Ultraschalluntersuchungen vorzugsweise nach Zusatz eines Kryoprotektors, wie z.B. Laktose, Polyvinylpyrrolidon, Mannitol, Glycin gefriertrocknen.

Beispiel 2

500 mg Poly-L-Lysin (MG 5000) werden in 20 ml destilliertem Wasser gelöst und mit Phosphatpuffer auf pH 4.5 eingestellt. 100 mg Acrylsäureglycidester dazugegeben, das Gemisch wird mit einem schnellaufenden Rührer unter Kühlung bei 20 °C gerührt. Es werden 10 mg Ammoniumperoxydisulfat und 0,1 ml N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin zugegeben. Es wird für weitere 90 Minuten gerührt. Die entstandenen gasgefüllten Mikropartikel werden durch Flotation abgetrennt. Die Teilchengröße der Mikropartikel liegt zwischen 0,2 und 6 µm.

Beispiel 3

- 5 7,5 g Polygeline werden in 200 ml Wasser für Injektionszwecke gelöst. Die Lösung wird mit Phosphorsäure auf pH 3,0 eingestellt und mit Wasser für Injektionszwecke zu 300 ml ergänzt. Die Lösung wird durch einen 0,22 µm Filter zur Sterilfiltration filtriert und mit einem schnelldrehenden Dissolver bei 6000 Upm gerührt. Unter Rühren werden langsam eine Mischung aus 1.5 ml
- 10 Cyanacrylsäureisopropylester und 1,5 ml Cyanacrylsäurebutylester zugetropft. Es wird 120 Minuten lang weitergerührt. Die entstandene Suspension wird drei Tage im Scheidetrichter flotiert. Das weitere Vorgehen entspricht Beispiel 1. Die entstandenen Mikropartikel enthalten Gas. Sie eignen sich als Kontrastmittel für Ultraschalluntersuchungen. Ihr
- 15 Wandmaterial besteht zu ca. 22 % (M/M) aus Biopolymer, zu ca. 40 % (M/M) aus Polycyanoacrylsäurebutylester und zu ca. 38 % (M/M) aus Polycyanoacrylsäureisopropylester. Sie lassen sich ohne Zusatz grenzflächenaktiver Hilfsstoffe in Wasser dispergieren ohne dabei zu aggregieren. Ihre Teilchengröße beträgt ca. 0,2 - 6 µm.
- 20

Beispiel 4

- 10 g Humanalbumin werden in 200 ml Wasser für Injektionszwecke gelöst.
- 25 Die Lösung wird mit Salzsäure auf pH 4,0 eingestellt und mit Wasser für Injektionszwecke zu 300 ml ergänzt. Die Lösung wird durch einen 0,22 µm Filter zur Sterilfiltration filtriert und mit einem schnelldrehenden Dissolver bei 10000 Upm gerührt. Unter Rühren werden langsam 2 ml
- 30 Cyanacrylsäureisopropylester zugetropft. Es wird 60 Minuten lang weitergerührt. Die entstandene Suspension wird drei Tage im Scheidetrichter flotiert. Das weitere Vorgehen entspricht Beispiel 1. Die entstandenen Mikropartikel enthalten Gas. Sie eignen sich als Kontrastmittel für Ultraschalluntersuchungen. Ihr Wandmaterial besteht zu ca. 30 % (M/M) aus
- 35 Humanalbumin und zu ca. 70 % (M/M) aus Polycyanoacrylsäureisopropylester. Sie lassen sich ohne Zusatz grenzflächenaktiver Hilfsstoffe in Wasser dispergieren ohne dabei zu aggregieren. Ihre Teilchengröße beträgt durchschnittlich ca. 0,2 - 3 µm.

Beispiel 5

250 ml Oxypolygelatine-Lösung werden mit Salzsäure auf pH 2,5 eingestellt
5 und mit Wasser für Injektionszwecke zu 300 ml ergänzt. Die Lösung wird
durch einen 0,22 µm Filter zur Sterilfiltration filtriert und mit einem
schnelldrehenden Rotor-Stator-Rührer bei 8000 Upm gerührt. Unter Rühren
werden langsam 3 ml Cyanacrylsäurebutylester zugetropft. Es wird 90
Minuten lang weitergerührt. Die entstandene Suspension wird drei Tage im
10 Scheidetrichter flotiert. Das weitere Vorgehen entspricht Beispiel 1. Die
entstandenen Mikropartikel enthalten Gas. Sie eignen sich als Kontrastmittel
für Ultraschalluntersuchungen. Ihr Wandmaterial besteht zu ca. 25 % (M/M)
aus Oxypolygelatine und zu ca. 75 % (M/M) aus
Polycyanoacrylsäurebutylester. Sie lassen sich ohne Zusatz
15 grenzflächenaktiver Hilfsstoffe in Wasser dispergieren ohne dabei zu
aggregieren. Ihre Teilchengröße beträgt ca. 0,2 - 4 µm.

Beispiel 6

20 500 mg Fibronektin werden in 5 ml destilliertem Wasser gelöst und mit
Salzsäure auf pH 3,5 eingestellt. Die Lösung wird durch einen 0,22 µm Filter
zur Sterilfiltration filtriert und mit einem schnelldrehenden Rotor-Stator-
Rührer in einem gekühlten 15 ml Gefäß (15 °C) bei 8000 Upm gerührt.
25 Unter Rühren werden langsam 0,3 ml Cyanacrylsäurebutylester zugetropft.
Es wird 90 Minuten lang weitergerührt. Die entstandene Suspension wird
drei Tage im Scheidetrichter flotiert. Der Überstand wird in 2 ml Wasser für
Injektionszwecke, welches 100 mg Mannitol enthält, suspendiert. Die
Suspension wird bei -50 °C unter Schütteln eingefroren und
30 gefriergetrocknet. Vor Anwendung werden die Mikropartikel mit 2 ml
Wasser für Injektionszwecke redispergiert. Die Teilchengröße der
Mikropartikel beträgt durchschnittlich 0,8 µm. Sie sind als Kontrastmittel für
Ultraschalluntersuchungen geeignet. Das Wandmaterial der Mikropartikel
besteht zu ca. 35 % (M/M) aus Fibronektin und zu ca 65 % (M/M) aus
35 Polycyanoacrylsäurebutylester.

Beispiel 7

100 mg eines Antikörpers gegen Fibrin werden in 4 ml Phosphatpuffer (pH 4,5) gelöst. Die Lösung wird durch einen 0,22 µm Filter zur Sterilfiltration
5 filtriert und in einem doppelwandigen Rührgefäß (Fassungsvolumen 10 ml) mit einem schnelldrehenden Dissolver-Rührer unter Kühlung bei 6000 Upm gerührt. Während des Rührens werden langsam 0,2 ml Cyanacrylsäurebutylester zugetropft. Es wird 60 Minuten lang weitergerührt. Die entstandene Suspension wird zwei Tage im Scheidetrichter flotiert. Der
10 Unterstand wird abgelassen. der Überstand wird mit 200 mg Laktose und 2 ml Wasser für Injektionszwecke versetzt. Die Suspension wird unter Schütteln im Kältebad bei -40 °C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Vor Anwendung werden die Mikropartikel mit 2 ml Wasser für Injektionszwecke resuspendiert. Sie sind gasgefüllt und eignen
15 sich als Kontrastmittel für Ultraschalluntersuchungen. Ihre Teilchengröße beträgt durchschnittlich ca. 1 µm. Das Wandmaterial der Mikropartikel besteht zu ca. 20 % (M/M) aus dem Antikörper und zu ca. 80 % (M/M) aus Polycyanoacrylsäurebutylester.

20

Beispiel 8

15 g Polygeline werden in 50 ml Wasser für Injektionszwecke gelöst, unter pH-Kontrolle wird tropfenweise 2 N Natronlauge zugegeben. Es werden
25 insgesamt 2 g Diglykolsäureanhydrid successive zugegeben, wobei der pH-Wert zwischen 7,5 und 8,0 gehalten wird. Nach Beendigung der Reaktion wird die überschüssige Diglykolsäure durch mehrfache Ultrafiltration (Ausschlußgrenze MG 1000) aus der Lösung entfernt. Die acylierte Polygelinelösung wird mit Wasser für Injektionszwecke auf 300 ml ergänzt
30 und durch einen 0,22 µm Filter filtriert. Unter Rühren bei 10000 Upm werden langsam 3 ml Cyanacrylsäurebutylester zugesetzt. Nach beendeter Zugabe wird 60 Minuten lang weitergerührt. Die entstandenen gasgefüllten Mikropartikel werden durch Zentrifugation bei 1500 Upm (30 Minuten) abgetrennt und in 50 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen. Sie
35 sind ohne Zusatz oberflächenaktiver Hilfsstoffe in Wasser dispergierbar ohne zu aggregieren. Ihre Teilchengröße liegt bei 0,1 - 6 µm. Das Wandmaterial der Mikropartikel besteht zu ca. 45 % (M/M) aus acylierter Polygeline und zu ca. 55 % (M/M) aus Polycyanoacrylsäurebutylester.

Beispiel 9

- 5 20 ml der nach Beispiel 3 hergestellten gasenthaltenden Mikropartikel werden in 20 ml Phosphatpuffer pH 4,5 aufgenommen. Die Suspension wird bei 4 °C gerührt (100 Upm) und es werden 25 mg (3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-HCl dem Gemisch hinzugefügt. Nach 60 Minuten werden 25 mg Fibronectin, die zuvor in 10 ml Phosphatpuffer gelöst
- 10 wurden, zu der Mikropartikelsuspension gegeben. Es wird über 60 Minuten bei 4 °C und weitere 120 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Suspension dreifach gegen Phosphatpuffer pH 4,5 dialysiert (Ausschlußgrenze MG 1000) und zwei Tage im Scheidetrichter floriert. Der Überstand wird in 20 ml Wasser für Injektionszwecke
- 15 aufgenommen, mit 5 % Polyvinylpyrrolidon (m/V) versetzt, bei -40 °C unter Schütteln eingefroren und gefriergetrocknet.

Beispiel 10

- 20 Das Lyophilisat aus Beispiel 9 wird mit 20 ml 5 % iger Glukoselösung resuspendiert. 0,1 ml davon werden zu 10 ml PBS-Lösung von 37 °C gegeben, die einen frisch hergestellten Fibrinclot enthält (Durchmesser 1 mm). Nach 10 minütiger Inkubation unter Schütteln im Wasserbad wird der
- 25 Clot entnommen, fünffach mit je 10 ml PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend sonographisch untersucht. Im Farbdoppler lassen sich eindeutig Signale anhängender Mikropartikel nachweisen. Mit den Partikeln aus Beispiel 3 (ohne die in Beispiel 9 gezeigte Umsetzung mit Fibronectin) wird analog verfahren. Bei der sonographischen Untersuchung der Clots lassen
- 30 sich (auch im Farbdoppler) keine anhängenden Mikropartikel nachweisen.

Beispiel 11

- 35 5 ml der nach Beispiel 3 hergestellten gasenthaltenden Mikropartikel werden in 5 ml Phosphatpuffer pH 4,5 aufgenommen. Die Suspension wird bei 4 °C gerührt (100 Upm), und es werden 10 mg (3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-HCl dem Gemisch hinzugefügt. Nach fünf Minuten werden

-15-

2,5 mg eines Antikörpers gegen Fibrin (Nr. 0541 clone E8, Immunotech, Marseille, Frankreich), die zuvor in 1 ml Phosphatpuffer gelöst wurden, zu der Mikropartikelsuspension gegeben. Es wird 60 Minuten bei 4 °C und weitere 120 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die
5 Suspension dreifach gegen Phosphatpuffer pH 4,5 dialysiert (Ausschlußgrenze MG 1000) und zwei Tage im Scheidetrichter floriert. Der Überstand wird in 2 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen, mit 5 % Polyvinylpyrrolidon (m/V) versetzt, bei -40 °C unter Schütteln eingefroren und gefriergetrocknet.

10

Beispiel 12

Das Lyophilisat aus Beispiel 11 wird mit 2 ml 5 % iger Glukoselösung
15 resuspendiert. 0,1 ml davon werden zu 10 ml PBS-Lösung von 37 °C gegeben, die einen frisch hergestellten Fibrinclot enthält (Durchmesser 1 mm). Nach 10 minütiger Inkubation unter Schütteln im Wasserbad wird der Clot entnommen, fünf Mal mit je 10 ml PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend sonographisch untersucht. Im Farbdoppler lassen sich eindeutig
20 Signale anhängender Mikropartikel nachweisen. Mit den Partikeln aus Beispiel 3 (ohne die in Beispiel 11 gezeigte Umsetzung mit dem Antikörper gegen Fibrin) wird analog verfahren. Bei der sonographischen Untersuchung der Clots lassen sich (auch im Farbdoppler) keine anhängenden Mikropartikel nachweisen.

25

Beispiel 13

0,1 ml der resuspendierten Partikel aus Beispiel 6 werden im
30 Versuchsaufbau analog Beispiel 11 auf ihre Fibrinbindung geprüft. In der sonographischen Untersuchung lassen sich deutlich an den Clot gebundene Mikropartikel nachweisen.

-16-

Beispiel 14

0,1 ml der resuspendierten Partikel aus Beispiel 7 werden im Versuchsaufbau analog Beispiel 11 auf ihre Fibrinbindung geprüft. In der sonographischen Untersuchung lassen sich deutlich an den Clot gebundene Mikropartikel nachweisen.

Beispiel 15

10

10 ml der nach Beispiel 8 hergestellten Mikropartikel werden in 10 ml Phosphatpuffer pH 4,5 aufgenommen, und es werden 20 mg 1-Hydroxybenzotriazol hinzugefügt. Nach Abkühlen auf 4 °C wird gerührt (100 Upm), und es werden 10 mg (3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-HCl zugegeben. Es wird 60 Minuten lang bei 4 °C weitergerührt. Danach wird für weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Suspension werden bei Raumtemperatur 10 mg Pankreozymin, die zuvor in 5 ml Phosphatpuffer gelöst wurden, gegeben. Es wird über 120 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Suspension fünf Mal gegen Phosphatpuffer pH 4,5 dialysiert (Ausschlußgrenze MG 1000) und zwei Tage im Scheidetrichter floriert. Der Überstand wird in 10 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen, mit 5 % Polyvinylpyrrolidon (m/V) versetzt, bei -40 °C unter Schütteln eingefroren und anschließend gefriergetrocknet.

25

Beispiel 16

Das Lyophilisat aus Beispiel 15 wird mit 10 ml Wasser für Injektionszwecke resuspendiert. 0,1 ml der Suspension werden einer Ratte in die Schwanzvene injiziert. Nach 10 Minuten wird das Pankreas entnommen und im Wasserbad sonographisch untersucht. Im Farbdoppler sind Ultraschallsignale der Mikropartikel zu erkennen.

35

Beispiel 17

5 ml der nach Beispiel 3 hergestellten gasenthaltenden Mikropartikel werden in 5 ml Phosphatpuffer pH 4,5 aufgenommen. Die Suspension wird bei 4 °C gerührt (100 Upm), und es werden 10 mg (3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-HCl dem Gemisch hinzugefügt. Nach fünf Minuten werden 5 mg tPA, die zuvor in 1 ml Phosphatpuffer gelöst wurden, zu der Mikropartikelsuspension gegeben. Es wird über 24 Stunden bei 4 °C weitergerührt. Anschließend wird die Suspension dreifach gegen Phosphatpuffer pH 4,5 dialysiert (Ausschlußgrenze MG 1000) und zwei Tage im Scheidetrichter floriert. Der Überstand wird in 2 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen.

Beispiel 18

Es werden zwei Fibrinclots (Masse je ca. 50 mg) hergestellt, die in 20 ml Plasma gegeben werden. Zu den Clots werden 0,05 ml der nach Beispiel 17 hergestellten Partikelsuspension gegeben. Nach 10 Minuten werden die Clots aus dem Plasma entnommen, in der sonographischen Untersuchung zeigen sich im Farbdoppler Signale anhängender Mikropartikel.

Beispiel 19

In 20 ml einer wässrigen Suspension aus Magnetitpartikeln (ca. 20 mmol Eisen/ml, Durchmesser der Partikel ca. 20 nm) werden 0,6 g Gelatine gelöst. Die Lösung wird mit Salzsäure auf pH 3 eingestellt. Unter Rühren (3000 Upm) werden 0,2 ml Cyanacrylsäureisobutylester langsam zugesetzt. Nach beendeter Zugabe wird 90 Minuten lang weitergerührt. Die Suspension wird zentrifugiert (2000 Upm, 60 Minuten). Der Überstand wird verworfen, der Unterstand wird in 10 ml PBS pH 7,4 (10 mmol) aufgenommen. Die Suspension wird auf 4 °C abgekühlt und es werden unter Rühren (100 Upm) 10 mg (3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-HCl zugegeben. Es wird 60 Minuten lang bei 4 °C weitergerührt. Danach werden 5 mg eines Antikörpers gegen Fibrin (Nr. 0541 clone E8, Immunotech, Marseille, Frankreich) zugegeben. Es wird 60 Minuten bei 4 °C und anschließend 120 Minuten bei Raumtemperatur weitergerührt. Die Suspension wird fünf Mal

-18-

gegen PBS pH 7,4 (10 mmol) ultrafiltriert (Ausschlußgrenze MG 5000).
Danach wird die Suspension zentrifugiert (2000 Upm, 60 Minuten). Der
Unterstand wird in 5 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen, das 5
% Mannitol (m/V) enthält und durch einen 5 µm Membranfilter filtriert. Das
5 Filtrat wird bei -40 °C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet.

Beispiel 20

10 15 g Gelatine (300 Bloom) werden in 150 ml Wasser für Injektionszwecke
bei 80 °C gelöst. Nach dem Erkalten wird die Lösung mit 0,1 N HCl auf pH
2,5 eingestellt und mit Wasser für Injektionszwecke zu 300 ml ergänzt. Die
Lösung wird autoklaviert (Verfahren A 121, Deutsches Arzneibuch 9.
Ausgabe). Der pH-Wert der autoklavierten Lösung wird kontrolliert und
15 erforderlichenfalls zu pH 2,5 korrigiert. Zu der Lösung werden unter Rühren
3 ml Cyanacrylsäureisobutylester gegeben. Es wird 90 Minuten
weitergerührt. Die entstandene Mikropartikelsuspension wird bei 1000 Upm
60 min lang zentrifugiert, der Überstand in 50 ml Wasser für
Injektionszwecke aufgenommen und erneut bei 1000 Upm 60 min lang
20 zentrifugiert. Dies wird insgesamt 5 mal wiederholt. Der Überstand der
letzten Zentrifugation wird in 50 ml PBS (pH 7,0) aufgenommen und unter
Rühren zu 0,1 mg festem Diethylentriaminpentaessigsäuredianhydrid (vgl.:
Hnatowich et al (1983) Science 220:613) gegeben. Es wird 5 Minuten
gerührt. Die Suspension wird bei 1000 Upm 60 min lang zentrifugiert, der
25 Überstand in 50 ml Wasser für Injektionszwecke aufgenommen. Die
Zentrifugation gegen Wasser für Injektionszwecke wird noch 4 mal
wiederholt. Der Überstand der letzten Zentrifugation wird mit 50 ml Wasser
für Injektionszwecke aufgenommen und durch eine Filterkolonne aus HDC-
Porenfiltern der Porengrößen 70, 40, 20 und 10 µm filtriert. Das Filtrat
30 enthält ca 2×10^9 Partikel/ml, die DTPA-Gruppen auf ihrer Oberfläche
besitzen. Die mittlere Partikelgröße beträgt ca. 2 µm. Die Partikel lassen sich
mit den bekannten Methoden mit radioaktiven Metallionen (z.B. In-111 oder
Tc-99) markieren.

Beispiel 21

Fibrinclot wie Beispiele zur Schallanwendung, nur mit Gammacounter statt mit Doppler Nachweis führen.

5

Beispiel 22

7,5 g Polygeline werden in 150 ml Wasser für Injektionszwecke bei 80 °C
10 gelöst. Nach dem Erkalten wird die Lösung mit 0,1 N HCl auf pH 3
eingestellt und mit Wasser für Injektionszwecke zu 300 ml ergänzt. Die
Lösung wird autoklaviert (Verfahren A 121, Deutsches Arzneibuch 9.
Ausgabe). Der pH-Wert der autoklavierten Lösung wird zu pH 2 korrigiert. Zu
der Lösung werden unter Rühren 3 ml Cyanacrylsäurebutylester gegeben. Es
15 wird 90 Minuten weitergerührt. Die entstandene Mikropartikelsuspension
wird bei 1000 Upm 60 min lang zentrifugiert, der Überstand in 50 ml
Wasser für Injektionszwecke aufgenommen und erneut bei 1000 Upm 60
min lang zentrifugiert. Dies wird insgesamt 5 mal wiederholt. Der Überstand
der letzten Zentrifugation wird in 50 ml PBS (pH 7,4) aufgenommen und auf
20 4 °C abgekühlt. Unter Rühren bei 4 °C werden 50 mg Streptavidin und 5 mg
EDC zugegeben. Es wird 1 h weitergerührt. Die Suspension wird 3 mal
zentrifugiert (1000 Upm, 60 min). Nach jeder Zentrifugation wird der
Überstand mit 50 ml PBS (pH 7,0, 10mM Phosphat) aufgenommen. Der
Antikörper gegen Fibrin wird in einem molaren Verhältnis von 1:5 mit
25 sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)-hexanoat (NHS-LC-Biotin) nach der
Methode von DJ Hnatovitch et al, J. Nucl. Med. 28 (1987) 1294-1302
markiert.

30 Beispiel 23

Es werden 0,5 mg des Biotin-markierten Antikörpers gegen Fibrin aus
Beispiel 22 einem mit einer Cholesterin enthaltenden Diät gefütterten
Kanninchen intravenös injiziert. Nach 3 Stunden werden die Partikel aus
35 Beispiel 22 nachinjiziert. 10 Minuten später wird dem zuvor getötetem Tier
die Halsarterie entnommen und es werden die atherosklerotischen
Arterienabschnitte im Wasserbad im Dopplermodus auf Kontrastmittelsignale

-20-

untersucht. Es lassen sich eindeutige Schallsignale von anhaftenden Partikeln nachweisen.

5 Beispiel 24

- a) 20 ml der nach Beispiel 8 hergestellten Mikropartikelsuspension werden mittels 5 ml Phosphatpuffer auf einen pH-Wert von 4,5 gebracht und anschließend mit 50 mg eines 125-Iod markierten Antikörpers gegen Fibrin (5 μ Ci) versetzt. Unter Rühren bei 4 °C werden, zu der Reaktionsmischung 500 mg (3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid gegeben. Anschließend wird 8 Stunden unter Kühlung weitergerührt, die Mikropartikel durch Zentrifugation abgetrennt und insgesamt dreimal mit je 20 ml Wasser für Injektionszwecke gewaschen, wobei jeder einzelne Waschvorgang in der Weise erfolgt, daß die Partikel in Wasser resuspendiert und anschließend zentrifugiert werden. Nach dem letzten Waschvorgang werden die Partikel in 20 ml Wasser für Injektionszwecke resuspendiert.
- Der Bindungsgrad des Antikörpers auf dem Partikel wird mit einem Gamma-Counter anhand der 125-Jod Aktivität bestimmt. Danach sind 93 % der ursprünglich eingesetzten Antikörpermengende fest an die Partikeloberfläche gebunden.
- b) Mikropartikel hergestellt nach Beispiel 4 der DE 38 03 972 werden in einer dem Beispiel 24 a) entsprechenden Menge mit 50 mg eines 125-Jod markierten Antikörpers gegen Fibrin (5 μ Ci) unter sonst identischen Reaktionsbedingungen umgesetzt.
- Ein Vergleich des Bindungsgrads mit den Partikeln nach Beispiel 24 a) zeigt einen erheblich geringeren Wert von nur 1 %.

Patentansprüche

1. Mikrokapseln für die Diagnose und/oder Therapie aus biologisch abbaubaren Polymeren, dadurch gekennzeichnet, daß
5 das Wandmaterial aus einem Mischpolymeren aus mindestens einem synthetischen polymeren Material und mindestens einem Biopolymeren besteht, welches
 - a) orts-, struktur- oder gewebespezifische Eigenschaften aufweist oder
 - b) funktionelle Gruppen besitzt, über welche gegebenenfalls
10 chelatisierende Liganden oder deren Metallkomplexe und/oder orts-, struktur- oder gewebespezifische Substanzen gebunden sind, und gegebenenfalls zusätzlich einen oder mehreren pharmazeutischer(n) Wirkstoff(en) enthältund das der Kern der Kapseln aus
 - 15 a) einem Gas oder Gasgemischen und/oder
 - b) einem pharmazeutischen Wirkstoff oder Wirkstoffgemisch oder
 - c) dem gleichen Material wie die Kapselwand besteht,unter den Maßgaben, daß das synthetische polymere Material nicht aus polymerisierbaren Aldehyden aufgebaut ist, daß das Gewichtsverhältnis vom Biopolymer zum synthetischen Polymer im Bereich von 10:90 bis
20 80:20 liegt und das die Mikrokapselgröße 0,5 bis 8 μm beträgt.
2. Mikrokapseln gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das synthetische Polymere aus monomerer Acrylsäure, Acrylamid,
25 Acrylsäurechlorid, Acrylsäureglycidester oder monomeren Alkylcyanoacrylaten aufgebaut wird.
3. Mikrokapseln gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Biopolymer ein gegebenenfalls glykosiliertes Polypeptid, bevorzugt
30 Albumin, Fibrinogen, Fibronectin oder ein Collagenabbauprodukt, bevorzugt Gelatine, Polygeline, Oxypolygelatine oder Poly-L-Lysin ist.
4. Mikrokapseln gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die
35 gegebenenfalls über die funktionellen Gruppen des Biopolymeren gebundene orts-, struktur und gewebespezifische Substanzen Antikörper, konjugierte Antikörper, Hormone, Transferrin, Fibronectin, Heparin, Transcobalamin, epidermaler Wachstumsfaktor, Lipoproteine,

-22-

Plasmaproteine, Peptide oder Oligopeptide sind, die bevorzugt die Aminosäuresequenzen RGD, RGDS, RGDV oder RGDT enthalten.

- 5 5. Mikrokapseln gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Biopolymer ein Polypeptid mit orts-, struktur und gewebespezifischen Eigenschaften ist.
- 10 6. Mikrokapseln gemäß Anspruch 1-5 zur Anwendung in der Ultraschall-Diagnostik, dadurch gekennzeichnet, daß das Wandmaterial ein Gas, bevorzugt Luft, Stickstoff, Kohlendioxid, Sauerstoff, Helium, Neon, Argon, Krypton oder ein Gemisch aus mindestens zwei dieser Gasen, einschließt.
- 15 7. Mikrokapseln gemäß Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß der über die funktionellen Gruppen des Biopolymeren gebundenen Reste chelatierende Liganden sind.
- 20 8. Mikrokapseln gemäß Anspruch 1-5 und 7 enthaltend als chelatisierende Liganden Ethylendiaminpentaessigsäure-Reste oder deren Derivate.
9. Mikrokapseln gemäß Anspruch 1-5, 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß die über die funktionellen Gruppen des Biopolymeren gebundenen Reste Chelat-Komplexe eines Metallions sind.
- 25 10. Mikrokapseln gemäß Anspruch 1-5 und 7-9, dadurch gekennzeichnet, daß die komplex gebundenen Metallionen paramagnetisch, bevorzugt Gadoliniumionen sind.
- 30 11. Mikrokapseln gemäß Anspruch 9-10 zur Anwendung in der NMR-Diagnostik.
12. Mikrokapseln gemäß Anspruch 1-5 und 7-9, dadurch gekennzeichnet, daß die komplex gebundenen Metallionen Radioisotope, bevorzugt ^{99m}Tc Technetium- oder ^{111}In Indium-Ionen sind.
- 35 13. Mikrokapseln gemäß Anspruch 12 zu Anwendung in der Szintigraphie.

14. Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Monomere in einer Konzentration von 0,01 - 10 % (m/V) , bevorzugt 0,1 - 10 % bezogen auf das Gesamtvolumen der Herstellungslösung unter Dispergieren in gasgesättigter, gegebenenfalls autoklavierter, wässriger Phase, die ein gelöstes Biopolymer in einer Konzentration von 0,5 - 20 % (m/V) bevorzugt 1% - 15 % (m/V)), sowie gegebenenfalls zusätzlich magnetische Partikel enthält, polymerisiert wird, unter der Maßgabe, daß das Gewichtsverhältnis von Biopolymerem zu synthetischem Polymeren 10:90 bis 80:20 ist, nach beendeter Polymerisation die entstandenen Mikropartikel je nach Dichte und Partikelgröße durch einmalige oder mehrmalige Zentrifugation, Filtration, Sedimentation oder Flotation abtrennt, gegebenenfalls durch Dialyse weiter reinigt und in einem physiologisch verträglichen Suspensionsmittel suspendiert und anschließend gegebenenfalls mit Chelatbildnern, Metallchelaten und/oder orts-, struktur-oder gewebespezifischen Substanzen umsetzt und diese Suspension, bevorzugt unter Zumischung von Gerüstbildnern, gefriertrocknet.
15. Kontrastmittel, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikropartikel nach Anspruch 1 in einem pharmazeutisch akzeptablen Suspensionsmedium resuspendiert werden.
16. Kontrastmittel gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß als pharmazeutisch akzeptables Suspensionsmedium Wasser für Injektionszwecke, das gegebenenfalls einen Zusatz von Kochsalz, Glucose, Mannitol und/oder Lactose und gegebenenfalls zusätzlich einen mehrwertigen Alkohol enthält, verwendet wird.
17. Kontrastmittel herstellbar nach dem in den Ansprüchen 14 beschriebenen Verfahren, dadurch gekennzeichnet, daß auf eine abschließende Gefriertrocknung verzichtet wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.
PCT/EP 93/02422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 A61K49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	EP, A, 0 458 745 (SINTETICA) 27 November 1991 see column 9, line 2 - line 50 see column 10, line 9 - line 33; claims ---	1-17
Y	EP, A, 0 441 468 (SCHERING AG.) 14 August 1991 cited in the application see column 31, line 9 - column 46; claims ---	1-17
A	EP, A, 0 327 490 (SCHERING AG) 9 August 1989 cited in the application see column 2, line 24 - line 51; claims ---	1-17
P, X, Y	WO, A, 92 17213 (NYCOMED AS) 15 October 1992 see page 7, line 6 - line 20; claims ----- -/--	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 January 1994

Date of mailing of the international search report

09.02.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 93/02422

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
----------	--	-----------------------

Y	<p>BRITISH MEDICAL JOURNAL vol. 1, no. 5952, February 1975, (LONDON) pages 247 - 249 J.P. BOLTON ET AL. 'INCIDENCE OF EARLY POST-OPERATIVE ILIOFEMORAL THROMBOSIS' see page 247, column 1, paragraph 1 -----</p>	1-17
---	--	------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat Application No
PCT/EP 93/02422

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP-A-0458745	27-11-91	AU-B-	636481	29-04-93
		AU-A-	7614491	21-11-91
		CA-A-	2042722	19-11-91
		CN-A-	1056634	04-12-91
		JP-A-	4226923	17-08-92
		NZ-A-	238160	23-12-93

EP-A-0441468	14-08-91	DE-A-	4004430	14-08-91
		AU-A-	7098291	17-10-91
		JP-A-	5009132	19-01-93

EP-A-0327490	09-08-89	DE-C-	3803971	07-09-89
		DE-A-	3803972	10-08-89
		AU-B-	635200	18-03-93
		AU-A-	3035189	25-08-89
		WO-A-	8906978	10-08-89
		EP-A-	0398935	28-11-90
		JP-T-	3503634	15-08-91

WO-A-9217213	15-10-92	AU-A-	1428392	02-11-92
		AU-A-	1443992	02-11-92
		CA-A-	2107106	29-09-92
		CA-A-	2107107	29-09-92
		WO-A-	9217436	15-10-92
		EP-A-	0577659	12-01-94
		EP-A-	0576521	05-01-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/02422

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 5 A61K49/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 5 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X, Y	EP, A, 0 458 745 (SINETICA) 27. November 1991 siehe Spalte 9, Zeile 2 - Zeile 50 siehe Spalte 10, Zeile 9 - Zeile 33; Ansprüche	1-17
Y	--- EP, A, 0 441 468 (SCHERING AG.) 14. August 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe Spalte 31, Zeile 9 - Spalte 46; Ansprüche	1-17
A	--- EP, A, 0 327 490 (SCHERING AG) 9. August 1989 in der Anmeldung erwähnt siehe Spalte 2, Zeile 24 - Zeile 51; Ansprüche --- -/-	1-17

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Januar 1994

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

09.02.94

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Berte, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/02422

C.(Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X, Y	WO, A, 92 17213 (NYCOMED AS) 15. Oktober 1992 siehe Seite 7, Zeile 6 - Zeile 20; Ansprüche	1-17
Y	<p style="text-align: center;">---</p> BRITISH MEDICAL JOURNAL Bd. 1, Nr. 5952, Februar 1975, (LONDON) Seiten 247 - 249 J.P. BOLTON ET AL. 'INCIDENCE OF EARLY POST-OPERATIVE ILIOFEMORAL THROMBOSIS' siehe Seite 247, Spalte 1, Absatz 1 <p style="text-align: center;">-----</p>	1-17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 93/02422

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 1-17
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
In view of the definition of products by means of their biological, chemical and or pharmacological properties, the search has to be restricted for economic reasons. The search was limited to the compounds for which pharmacological data was given and/or the compounds mentioned in the claims or examples.
(SEE GUIDELINES, PART B, CHAPTER III, PARAGRAPH 3.6)
3. ☐ Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern.inales Aktenzeichen

PCT/EP 93/02422

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0458745	27-11-91	AU-B- 636481	29-04-93
		AU-A- 7614491	21-11-91
		CA-A- 2042722	19-11-91
		CN-A- 1056634	04-12-91
		JP-A- 4226923	17-08-92
		NZ-A- 238160	23-12-93

EP-A-0441468	14-08-91	DE-A- 4004430	14-08-91
		AU-A- 7098291	17-10-91
		JP-A- 5009132	19-01-93

EP-A-0327490	09-08-89	DE-C- 3803971	07-09-89
		DE-A- 3803972	10-08-89
		AU-B- 635200	18-03-93
		AU-A- 3035189	25-08-89
		WO-A- 8906978	10-08-89
		EP-A- 0398935	28-11-90
		JP-T- 3503634	15-08-91

WO-A-9217213	15-10-92	AU-A- 1428392	02-11-92
		AU-A- 1443992	02-11-92
		CA-A- 2107106	29-09-92
		CA-A- 2107107	29-09-92
		WO-A- 9217436	15-10-92
		EP-A- 0577659	12-01-94
		EP-A- 0576521	05-01-94

THIS PAGE BLANK (USPTO)